

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 8月29日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-250824

[ST.10/C]:

[JP2002-250824]

出 願 人

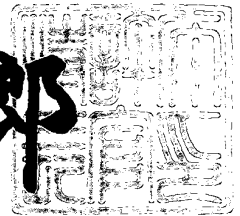
Applicant(s):

オリンパス光学工業株式会社

2003年 6月23日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3049104

【書類名】 特許願

【整理番号】 02P01219

【提出日】 平成14年 8月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G02B 21/00

【発明の名称】 走査型レーザー顕微鏡

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学
工業株式会社内

【氏名】 名取 靖晃

【特許出願人】

【識別番号】 000000376

【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100058479

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】

【識別番号】 100084618

【弁理士】

【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

【識別番号】 100068814

【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100091351

【弁理士】

【氏名又は名称】 河野 哲

【選任した代理人】

【識別番号】 100100952

【弁理士】

【氏名又は名称】 風間 鉄也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0010297

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 走査型レーザー顕微鏡

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 レーザー光を走査装置により対物レンズを介して試料上を走査し、試料からの蛍光を特定の波長を透過する蛍光測光フィルタを介して光検出器により検出するための第 1 の走査光学系と、

前記試料上の特定の部位にレーザー光を導入するための第 2 の走査光学系と、

前記試料上からの反射された前記第 2 の走査光学系からのレーザー光が前記第 1 の走査光学系の前記光検出器へ入射することを遮断するための吸収フィルタとを備えたことを特徴とする走査型レーザー顕微鏡。

【請求項 2】 前記第 1 の走査光学系のレーザー光と前記第 2 の走査光学系のレーザー光波長が異なることを特徴とする請求項 1 に記載の走査型レーザー顕微鏡。

【請求項 3】 前記吸収フィルタが交換可能に配置されることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の走査型レーザー顕微鏡。

【請求項 4】 前記吸収フィルタと前記蛍光測光フィルタとが別のフィルタであることを特徴とする請求項 1 乃至 3 の内いずれか 1 の請求項に記載の走査型レーザー顕微鏡。

【請求項 5】 前記光検出器を複数備えとともにこれらの光検出器に向けて試料からの蛍光を分光する分光手段を備え、

前記蛍光測光フィルタは、前記分光手段によって分光される複数の光路毎に配置され、

前記吸収フィルタは、前記分光手段の手前の共通光路に配置されていることを特徴とする請求項 1 乃至 4 の内いずれか 1 の請求項に記載の走査型レーザー顕微鏡。

【請求項 6】 前記第 1 の走査光学系に対して前記第 2 の走査光学系が着脱可能に構成されていることを特徴とする請求項 1 乃至 5 の内いずれか 1 の請求項に記載の走査型レーザー顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、レーザー光を走査装置により対物レンズを介して試料上を走査し、試料からの蛍光を光検出器により検出する走査型レーザー顕微鏡に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

特開 2 0 0 0 - 2 7 5 5 2 9 には、試料からの蛍光の走査画像を得るための第 1 の走査光学系 A と、試料の特定の部位に、例えばケージド試薬の開裂のような特異現象を発現させるための第 2 の走査光学系 B とを備えた走査型レーザー顕微鏡について開示されている。

【 0 0 0 3 】

図 6 は、従来の走査型レーザー顕微鏡の構成を示す図である。第 1 の走査光学系 A のレーザーシャッター 6 3 と走査光学系ユニット 6 4 および光電変換素子 7 0 と第 2 の走査光学系 B のレーザーシャッター 7 2 および走査光学系ユニット 7 3 をコントロールユニット 8 1 により制御することで、第 1 の走査光学系 A のレーザー光の走査に同期させて第 2 の走査光学系 B から試料 7 9 にレーザー光を照射して、試料 7 9 の時間的な変化の測定を可能にしている。

【 0 0 0 4 】

例えば、ケージド試薬とカルシウムイオンなどのイオン濃度に感受性を有する蛍光指示薬を試料 7 9 に導入する。第 2 の走査光学系 B のレーザー光源 7 1 からレーザー光がケージド試薬を導入した試料 7 9 に照射されると、照射された部位のケージド試薬のケージド基が開裂し、内部に包含されている物質が放出される。この放出による試料 7 9 内のイオン濃度分布の変化を上記第 1 の走査光学系 A のレーザー光源 6 1 からのレーザー光により得られる画像により測定する。このとき、ケージド試薬の開裂に伴い、また、第 2 のレーザー光源 7 1 のレーザー光の照射によっても、試料 7 9 のイオン感受性蛍光試薬がある程度の蛍光を生じることが、コントロールユニット 8 1 により各レーザー光のレーザーシャッター 6 3、7 2 の開閉タイミングと光電変換素子 7 0 での検出タイミングを時間的に制御しているため、ケージド試薬の開裂に伴う蛍光指示薬からの蛍光強度の変化の影響

を受けずに蛍光のスペクトルを光検出器により検出して蛍光画像を得ることを可能にしている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、特開2000-275529に記載されている第1および第2の走査光学系を有する走査型レーザー顕微鏡では、第2の走査光学系のレーザー光が第1の走査光学系の光検出器にて検出されてしまう可能性があり、所望の蛍光画像を得るためには更に改善の余地があった。

【0006】

例えば、ケージド試薬を開裂するための第2の走査光学系Bのレーザー光源71として、UVパルスレーザー（波長351nm）を用いるが、ケージド試薬を開裂するためには強い光強度が必要であるため、照射した第2の走査光学系のレーザー光の試料79からの反射光も強くなる。このとき、ダイクロイックミラー75では十分にUVパルスレーザー光の反射光が吸収されず、僅かながら第1の走査光学系Aの光路に透過してしまう。しかし、通常、第1の走査光学系Aつまり、画像取得用の走査光学系に使用されている、ダイクロイックミラー62、吸収フィルタ67等の各フィルタ類は、UVレーザーの短波長域についての性能を考慮しているものはほとんどなく、UVパルスレーザーの波長は反射および透過して光電変換素子70で検出されてしまい、鮮明な蛍光画像を得ることができない。

【0007】

同様に、ケージド試薬を開裂するための第2の走査光学系のレーザー光源71として、IRパルスレーザー（波長710nm）を用いる場合を考える。なお、このIRパルスレーザーは2光子励起を引き起こすことのできるレーザーとする。このIRパルスレーザーについても、試料79からの強い反射光がダイクロイックミラー75で十分に反射されずに、僅かながら第1の走査光学系Aの光路に透過してしまう。しかし、通常、第1の走査光学系Aつまり、画像取得用の走査光学系に使用されている各フィルタ類は、短波長を反射、長波長を透過するロングパスフィルタを使用している場合が多い。これらの吸収フィルタについては、

I R の長波長域を考慮していないために、蛍光波長より長波長の I R パルスレーザー光の波長は透過してしまい、光検出器で検出される。したがって、鮮明な蛍光画像を得ることができない。

【 0 0 0 8 】

また、上記の現象を防ぐために、記載されているようにレーザー照射のタイミングをずらすなどの第 1 および第 2 の走査光学系をコントロールユニット 8 1 で制御することで、第 2 の走査光学系 B のレーザー光の影響を避けることも考えられるが、この場合、走査光学系と検出光学系の制御を、同時かつ高速に行うことが要求され、また、これを実現するためには複雑な制御が必要となる。さらに、同時に 2 つのレーザー光を照射することができないので、試料 7 9 の時間的な変化を測定する際にはリアルタイム性が低下してしまうという問題がある。

【 0 0 0 9 】

本発明の目的は、このような複数の走査光学系を使用した場合においても、第 2 のレーザー光が第 1 の走査光学系の光検出系に進入することを防ぎ、第 1 の走査光学系のレーザー光により励起された蛍光を効率良く検出することが可能な走査型レーザー顕微鏡を提供することにある。

【 0 0 1 0 】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するための本発明は、レーザー光を走査装置により対物レンズを介して試料上を走査し試料からの蛍光を特定の波長を透過する蛍光測光フィルタを介して光検出器により検出するための第 1 の走査光学系と、試料上の特定の部位にレーザー光を導入するための第 2 の走査光学系と、試料上からの反射された第 2 の走査光学系からのレーザー光が第 1 の走査光学系の光検出器へ入射することを遮断するための吸収フィルタとを備えた走査型レーザー顕微鏡である。

【 0 0 1 1 】

また本発明は、上記記載の発明である走査型レーザー顕微鏡において、第 1 の走査光学系のレーザー光と第 2 の走査光学系のレーザー光波長が異なる走査型レーザー顕微鏡である。

【 0 0 1 2 】

また本発明は、上記記載の発明である走査型レーザー顕微鏡において、吸収フィルタが交換可能に配置される走査型レーザー顕微鏡である。

【 0 0 1 3 】

また本発明は、上記記載の発明である走査型レーザー顕微鏡において、吸収フィルタと蛍光測光フィルタとが別のフィルタである走査型レーザー顕微鏡である。

【 0 0 1 4 】

また本発明は、上記記載の発明である走査型レーザー顕微鏡において、光検出器を複数備えとともにこれらの光検出器に向けて試料からの蛍光を分光する分光手段を備え、蛍光測光フィルタは分光手段によって分光される複数の光路毎に配置され、吸収フィルタは分光手段の手前の共通光路に配置されている走査型レーザー顕微鏡である。

【 0 0 1 5 】

また本発明は、上記記載の発明である走査型レーザー顕微鏡において、第 1 の走査光学系に対して第 2 の走査光学系が着脱可能に構成されている走査型レーザー顕微鏡である。

【 0 0 1 6 】

【発明の実施の形態】

本発明の第 1 の実施の形態について説明する。図 1 は本発明に係る走査型レーザー顕微鏡の構成図である。

【 0 0 1 7 】

この走査型レーザー顕微鏡は、第 1 のレーザー光源 1 1 から出力されるレーザー光 1 1 a で試料 2 9 面上を走査する観察用の第 1 の走査光学系 A、第 2 のレーザー光源 2 1 から出力されるレーザー光 2 1 a を試料 2 9 の任意の位置に照射して、ケージド試薬を解除させるための第 2 の走査光学系 B とを備えている。第 2 の走査光学系 B は試料の特定部位に特異現象を発現させるための光学系である。

【 0 0 1 8 】

第 1 の走査光学系 A は、第 1 のレーザー光源 1 1、ダイクロイックミラー 1 2、第 1 のレーザーシャッタ 1 3、第 1 の走査光学ユニット 1 4、瞳投影レンズ 1

5 およびミラー 1 6 から構成される。さらに第 1 の走査光学系 A のダイクロイックミラー 1 2 の分岐光路上には、検出光学系 C が配置されている。この検出光学系 C は、吸収フィルタ 3 1、ダイクロイックミラー 1 7、ミラー 1 8、蛍光測光フィルタ 1 9 a および 1 9 b、共焦点レンズ 1 1 0 a および 1 1 0 b、共焦点絞リ 1 1 1 a および 1 1 1 b および光電変換素子 1 1 2 a および 1 1 2 b により構成される。

【 0 0 1 9 】

吸収フィルタ 3 1 は、試料 2 9 からの第 2 の走査光学系 B のレーザー光 2 1 a の反射光を吸収する特性を有する。通常、ケージド試薬の解除には UV 光が使用される。そこで、以下のようなレーザー光源が考えられる。

【 0 0 2 0 】

(a) 第 2 のレーザー光源 2 1 として、UV パルスレーザー (波長 3 5 1 n m) を使用する。

【 0 0 2 1 】

(b) 第 2 のレーザー光源 2 1 として、IR パルスレーザー (波長 7 1 0 n m) を使用する。なお、IR パルスレーザーは、2 光子励起現象を引き起こすことのできるレーザーとする。

【 0 0 2 2 】

従って、吸収フィルタ 3 1 の特性としては、上記のレーザー光を吸収する特性を有するものであり、具体的には図 2 に示すような特性を有するフィルタを用いる。

【 0 0 2 3 】

図 2 の (a) は、UV パルスレーザー (波長 3 5 1 n m) を遮断するフィルタ特性を示す図であり、図 2 の (b) は、IR パルスレーザー (波長 7 1 0 n m) を遮断するフィルタ特性を示す図である。

【 0 0 2 4 】

第 2 の走査光学系 B は、ケージド試薬を解除させるための第 2 のレーザー光源 2 1、第 2 のレーザーシャッタ 2 2、第 2 の走査光学ユニット 2 3、瞳投影レンズ 2 4 およびダイクロイックミラー 2 5 から構成される。第 1 の走査光学系 A の

光軸と第2の走査光学系の光軸とは、ダイクロイックミラー25により合成され、結像レンズ26、対物レンズ27に導かれる。また、瞳投影レンズ15および瞳投影レンズ24の焦点位置は、結像レンズ26の焦点位置と一致するように配置されている。試料29はステージ28上に置かれている。

【0025】

ここで、第1のレーザー光源11と第2のレーザー光源21として考えられる組合せと、その条件に適合するダイクロイックミラー25の特性は以下のとおりである。

【0026】

第1のレーザー光源11に可視連続レーザー（波長488nm）、第2のレーザー光源21としてUVパルスレーザー（波長351nm）を用いる場合は、ダイクロイックミラー25の透過率波長特性は、図3の（a）に示すように、可視連続光レーザー（波長488nm）及びその蛍光（波長530nm）を透過し、UVパルスレーザー（波長351nm）を反射する特性を有している。

【0027】

第1のレーザー光源11に可視連続レーザー（波長488nm）、第2のレーザー光源21としてIRパルスレーザー（波長710nm）を用いる場合は、ダイクロイックミラー25の透過率波長特性は、図3の（b）に示すように、ダイクロイックミラー25は、可視連続光レーザー（波長488nm）及びその蛍光（波長530nm）を透過し、IRパルスレーザー（波長710nm）を反射する特性を有している。

【0028】

第1のレーザー光源11にIRパルスレーザー（波長850nm）、第2のレーザー光源21としてIRパルスレーザー（波長710nm）を用いる場合は、ダイクロイックミラー25の透過率波長特性は、図3の（c）に示すように、IRパルスレーザー（波長850nm）及び波長530nmの蛍光を透過し、IRパルスレーザー（波長710nm）を反射する特性を有している。

【0029】

なお、ここで使用するIRパルスレーザーは、2光子励起現象を引き起こすこ

とのできるレーザーである。

【0030】

前記第1および第2のレーザーシャッター13および22、第1および第2の光学走査ユニット14および23、光電変換素子112aおよび112bは、コントロールユニット211に接続されている。このコントロールユニット211は、CRTディスプレイ212が接続されている。コントロールユニット211は後述するように、第2の走査光学系Bからのレーザー光の試料29への照射を第1の走査光学系Aの走査に同期させるものである。

【0031】

次に、このように構成した走査型レーザー顕微鏡の作用を説明する。第1のレーザー光源11からのレーザー光11aは、コントロールユニット211により開閉制御される第1のレーザーシャッター13が開状態のときに通過し、同じくコントロールユニット211により走査制御される第1の走査光学ユニット14へ導かれ、任意の方向に走査される。このレーザー光11aはさらに、瞳投影レンズ15、ミラー16、ダイクロイックミラー25、結像レンズ26、対物レンズ27を介して、試料29の断面210上に集光され、試料の断面210内を2次元走査する。

【0032】

試料29には、第1のレーザー光源11の波長によって励起される蛍光指示薬（例えばfluor-3、励起波長488nm、蛍光波長530nm）が導入されており、試料の断面210内をレーザー光が走査することにより、蛍光指示薬が励起されて蛍光を生じる。対物レンズ27に入射した蛍光は、上記レーザー光と同じ光路を逆向きに進み、対物レンズ27、結像レンズ26、ダイクロイックミラー12へ導かれる。ダイクロイックミラー12は、第1のレーザー光源11からのレーザー光11aの波長より長波長の光を反射する特性となっており、これにより上記蛍光はダイクロイックミラー12により反射され、検出光学系Cへ導入される。

【0033】

検出光学系Cにおいて、吸収フィルタ31を通過した蛍光は、多重染色されて

いる場合、ダイクロイックミラー 1 7 により各蛍光波長に分光される。各蛍光波長に分光した光は、それぞれ蛍光測光フィルタ 1 9 a および 1 9 b により特定の波長の光のみが通過し、さらに共焦点レンズ 1 1 0 a および 1 1 0 b で集光される。そして、試料の断面 2 1 0 と光学的に共役な位置にある共焦点絞リ 1 1 1 a および 1 1 1 b によって、試料の断面 2 1 0 からの光のみが光電変換素子 1 1 2 a および 1 1 2 b へ入射する。

【 0 0 3 4 】

光電変換素子 1 1 2 a および 1 1 2 b からの出力信号は、コントロールユニット 2 1 1 へ導かれ、走査制御に同期してデジタル信号に変換され、走査位置に対応して C R T ディスプレイ画面 2 1 2 上に表示される。表示された画像は、試料の断面 2 1 0 での蛍光画像（蛍光輝度の 2 次元分布）、すなわち所望のイオン濃度の断面 2 1 0 内での分布を示している。

【 0 0 3 5 】

一方、第 2 のレーザー光源 2 1 からのレーザー光 2 1 a は、コントロールユニット 2 1 1 が開閉制御する第 2 のレーザーシャッター 2 2 が開状態のときに、第 2 の走査光学ユニット 2 3、瞳投影レンズ 2 4、ダイクロイックミラー 2 5 を介して第 1 の走査光学系 A からの光軸と合成される。そして、結像レンズ 2 6、対物レンズ 2 7 を通過して、試料 2 9 の断面 2 1 0 上に照射される。この時の断面 2 1 0 内での照射位置は、コントロール 2 1 1 により第 2 の走査光学ユニット 2 3 を制御することで、第 1 の走査光学系 A の走査位置に依存しない任意の位置を選択することができる。

【 0 0 3 6 】

第 2 のレーザー光源 2 1 からのレーザー光 2 1 a が、ケージド試薬を導入した試料 2 9 に照射されると、照射された部位のケージド試薬のケージド基が開裂し、内部に包含されている物質が放出される。この放出による試料 2 9 内の上記イオン濃度分布の変化を、上記第 1 の走査光学系 A により得られる画像により測定できる。

【 0 0 3 7 】

このとき、上記の試料 2 9 上で反射した第 2 のレーザー光源 2 1 からのレーザ

ー光 2 1 a を含む反射光は、試料 2 9 の断面 2 1 0 上からの蛍光と同様に同じ光路を逆向きに進む。ダイクロイックミラー 2 5 へ達した第 2 のレーザー光 2 1 a の反射光は、ほとんど光がダイクロイックミラー 2 5 の性能により反射されるが、反射光の数%の光は反射されずに第 1 の走査光学系 A の光路へ導入される。第 1 の走査光学系 A へ導入された第 2 のレーザー光の反射光は、ミラー 1 6、瞳投影レンズ 1 5、走査光学ユニット 1 4 を通過して、ダイクロイックミラー 1 2 で反射され検出光学系の光路へ導かれる。

【 0 0 3 8 】

ダイクロイックミラー 1 2 で反射された第 2 の走査光学系 B からのレーザー光 2 1 a を含む反射光は、予め検出光学系 C の光路上に配置された前記第 2 の走査光学系 B からのレーザー光 2 1 a を吸収するような特性を持つ吸収フィルタ 3 1 で吸収される。よって、蛍光のみが吸収フィルタ 3 1 を通過し、光電変換素子 1 1 2 a、1 1 2 b で検出されるようになる。

【 0 0 3 9 】

このように、検出光学系 C に第 2 のレーザー光源 2 1 からのレーザー光 2 1 a を吸収するような特性を持つ吸収フィルタ 3 1 を用いて構成することで、試料 2 9 からの反射光に含まれる第 2 の走査光学系 B のレーザー光 2 1 a を確実に除去することができるので、第 1 の走査光学系 A で得られる蛍光画像が鮮明な画像として得られる。また第 1 のレーザー光 1 1 a と第 2 のレーザー光 2 1 a の同時照射も可能となる。更に、試料 2 9 が多重染色されている場合、図 1 に示すように上記吸収フィルタ 3 1 は検出光学系 C の各蛍光波長に対する共通光路へ配設すれば良いため、容易に構成することができる。

【 0 0 4 0 】

本発明の第 2 の実施の形態について説明する。図 4 は本発明に係る走査型レーザー顕微鏡の構成図である。第 1 の実施形態と同一部分には、同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

【 0 0 4 1 】

図 4 において、第 2 の走査光学系 B のレーザー光源として、UV パルスレーザー 3 4 と波長可変可能な IR パルスレーザー（2 光子励起現象を引き起こすこと

ができる I R パルスレーザー) 3 5 とが用いられ、レーザーシャッタ 3 6 および 3 7 の開閉制御により選択使用が可能のように構成されている。また、第 1 の走査光学系 A からのレーザー光 1 1 a の光軸と第 2 の走査光学系 B からのレーザー光 3 4 a もしくは 3 5 a の光軸とを合成する位置にダイクロイックミラー 2 5 が配置されており、前記ダイクロイックミラー 2 5 は、複数のダイクロイックミラーを備えることのできる電動ターレット 3 2 に少なくとも一つ構成されている。

【 0 0 4 2 】

さらに、第 2 の走査光学系 B のレーザー光源からのレーザー光 3 4 a もしくは 3 5 a を遮断するために、吸収フィルタ 3 1 が検出光学系 C の光路上に配置されており、この吸収フィルタ 3 1 は複数の吸収フィルタを備えることのできる電動ターレット 3 3 に少なくとも一つ構成されている。

【 0 0 4 3 】

なお、電動ターレット 3 2 および 3 3 は、通常、回転式であるが必要に応じてスライダ式としても良い。

【 0 0 4 4 】

また、前記電動ターレット 3 2 および 3 3、レーザーシャッタ 3 6 および 3 7 は、それぞれコントローラユニット 2 1 1 に接続されており、コントローラユニット 2 1 1 より制御が可能のように構成されている。

【 0 0 4 5 】

このように構成した走査型レーザー顕微鏡の作用を説明する。第 2 の走査光学系 B のレーザー光源として U V パルスレーザー 3 4 を用いる。第 1 の走査光学系 A のレーザー光源 1 1 からレーザー光 1 1 a および、第 2 の走査光学系 B のレーザー光源より出力される U V パルスレーザー光 3 4 a は、第 1 の実施の形態と同様に各光学素子を通過し、ダイクロイックミラー 2 5 で第 1 の走査光学系 A からのレーザー光 1 1 a の光軸と第 2 の走査光学系 B からの U V パルスレーザー光 3 4 a の光軸が合成される。このとき、ダイクロイックミラー 2 5 は、第 1 の走査光学系 A からのレーザー光 1 1 a を透過し、第 2 の走査光学系 B からのレーザー光である U V パルスレーザー光 3 4 a を反射するような特性を持つダイクロイックミラー 2 5 が、光路上にレーザーシャッタ 3 6 の開閉動作と連動して動作する

電動ターレット 32 により配置される。

【0046】

ダイクロイックミラー 25 で合成された第 1 および第 2 のレーザー光源からの各レーザー光は、第 1 の実施の形態と同様に、結像レンズ 26, 対物レンズ 27 を透過して、試料 29 の断面 210 上で集光し、UV パルスレーザー光 34 a によりケージド試薬が解除され、第 1 の走査光学系 A からのレーザー光 11 a により、蛍光指示薬が励起され蛍光を発生する。

【0047】

試料 29 より発生した蛍光と試料からの反射光である UV パルスレーザー光 34 a が第 1 の実施の形態と同様に、第 1 の走査光学系 A の光路をレーザー光とは逆向きに進み、ダイクロイックミラー 12 で蛍光および反射光である UV パルスレーザー光 34 a が検出光学系 C に導入される。

【0048】

検出光学系 C に導入された蛍光および UV パルスレーザー光 34 a は吸収フィルタ 31 で蛍光は通過し、UV パルスレーザー光は吸収される。このとき、吸収フィルタ 31 を有する電動ターレット 33 は、はレーザーシャッタ 36 の開閉動作と連動して動作し、UV パルスレーザー光を吸収するような特性を持つ吸収フィルタ 31 が光路上に予め配置されている。

【0049】

吸収フィルタ 31 を通過した蛍光は第 1 の実施の形態と同様に各光学素子を通過し、光電変換素子 112 a および 112 b で検出され、コントローラユニット 211 により信号処理され、CRT ディスプレイ 212 上に表示される。

【0050】

一方、ケージド試薬を解除するため、もしくは、タンパク質（例えば YFP）を発現させた試料を光褪色させるために、第 2 の走査光学系 B のレーザー光として IR パルスレーザー 35 を用いる場合がある。この場合、第 1 の走査光学系 A からのレーザー光の光軸と第 2 の走査光学系 B からの IR パルスレーザー光 35 a を合成するダイクロイックミラー 25 は、第 1 の走査光学系 A からのレーザー光 11 a を透過し、IR パルスレーザー光 35 a を反射するような特性を有する

。そしてこのダイクロイックミラー 2 5 は、レーザーシャッター 3 7 の開閉動作と連動して駆動する電動ターレット 3 2 によって予め配置されている。

【 0 0 5 1 】

また、検出光学系 C の吸収フィルタ 3 1 についても、上記と同様に蛍光を透過し、反射光である I R パルスレーザー光 3 5 a を吸収するような吸収フィルタ 3 1 が、レーザーシャッター 3 7 の開閉動作と連動して駆動する電動ターレット 3 3 により予め配置されている。

【 0 0 5 2 】

このように第 2 の実施の形態においては、第 1 の走査光学系 A からのレーザー光の光軸と第 2 の走査光学系 B からのレーザー光の光軸とを合成するダイクロイックミラー 2 5、および、検出光学系 C に試料 2 9 からの反射光である第 2 の走査光学系 B のレーザー光を吸収するような吸収フィルタ 3 1 をそれぞれ電動ターレット 3 2、3 3 に備え、また、前記電動ターレット 3 2 および 3 3 をレーザーシャッター 3 6 および 3 7 の開閉動作と連動して動作させることで、ケージド試薬の解除等に使用する第 2 の走査光学系 B のレーザー光源として、U V パルスレーザー 3 4 もしくは I R パルスレーザー 3 5 のいずれかを選択して使用することが可能なシステムを提供することができる。

【 0 0 5 3 】

また、電動ターレット 3 2、3 3 を図示しない手動ターレットにすることで、同様の性能を有するシステムを安価で提供することができる。

【 0 0 5 4 】

本発明の第 3 の実施の形態について説明する。図 5 は本発明に係る走査型レーザー顕微鏡の構成図である。第 1 および第 2 の実施形態と同一部分には、同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

【 0 0 5 5 】

本実施の形態の走査型レーザー顕微鏡は、観察用の第 1 の走査光学系 A と第 2 の走査光学系 B の結像レンズ 4 1 および 4 3 をそれぞれ独立に配置し、対物レンズ 2 7 を共用する構成になっている。

【 0 0 5 6 】

第 1 の走査光学系 A は、走査型レーザー顕微鏡 D として次のように構成される。第 1 のレーザー光源 1 1、第 1 のレーザーシャッタ 1 3、ダイクロイックミラー 1 2、第 1 の走査光学ユニット 1 4、瞳投影レンズ 1 5、結像レンズ 4 1、複数のダイクロイックミラーを備えることのできる電動ターレット 4 7 に少なくとも一つ配置されたダイクロイックミラー 4 2 および対物レンズ 2 7 から構成される。さらに第 1 の走査光学系 A のダイクロイックミラー 1 2 の分岐光路上には、検出光学系 C が配置されている。検出光学系 C については、第 2 の実施の形態と同様なので、説明を省略する。

【 0 0 5 7 】

前記第 1 の走査光学系 A の電動ターレット 4 7 に備えられているダイクロイックミラー 4 2 は、第 1 の走査光学系 A からのレーザー光の波長および長波長の光を反射すると共に、第 2 の走査光学系 B からのレーザー光を透過する特性となっている。

【 0 0 5 8 】

第 2 の走査光学系 B は、照明光導入装置 E として、第 2 のレーザー光源 2 1、第 2 のレーザーシャッタ 2 2、第 2 の走査光学ユニット 2 3、瞳投影レンズ 2 4、結像レンズ 4 3 およびミラー 4 4 から構成される。

【 0 0 5 9 】

なお、第 2 の走査光学系 B については、第 2 の走査光学ユニット 2 3 を省略した構成でも良い。

【 0 0 6 0 】

第 2 のレーザーシャッタ 2 2 と第 2 の走査光学ユニット 2 3 を制御するための信号は第 2 のコントロールユニット 4 5 で制御され、第 2 のコントロールユニット 4 5 は第 1 の走査光学系 A との同期制御のために第 1 のコントロールユニット 4 6 へ接続されている。

【 0 0 6 1 】

なお、第 2 のコントロールユニット 4 5 は必ずしも必要ではなく、第 2 のレーザーシャッタ 2 2 および第 2 の走査光学ユニット 2 3 を、直接第 1 のコントロールユニット 4 6 に接続しても良い。

【0062】

また、本実施の形態では走査型レーザー顕微鏡D、照明光導入装置Eは、それぞれ独立したユニット（筐体）として構成されており、かつ両者は取り付け、取り外しが可能な構造（例えばアリ構造はボルト締結など）になっている。

【0063】

次に、このように構成した走査型レーザー顕微鏡の作用について説明する。第1の走査光学系Aのレーザー光源11から出射したレーザー光11aは、第1の走査光学系Aの各光学素子を通過し、結像レンズ41で平行光となり、ダイクロイックミラー42で反射され対物レンズ27で集光され試料29の断面210上を走査する。試料29の断面210からの蛍光は、第1の実施の形態と同様な光路を進み検出光学系Cで検出される。

【0064】

一方、第2の走査光学系Bのレーザー光源21から出射したレーザー光21aは、第2の走査光学系Bの各光学素子を通過して結像レンズ43で平行光となり、ミラー44で反射されダイクロイックミラー42を介して、第1の走査光学系Aからの光軸と合成される。そして、対物レンズ27で集光され、試料29の断面210上に照射される。

【0065】

第2の走査光学系Bによる照射位置および範囲は、第1のコントロールユニット46から第2のコントロールユニット45および第2の走査光学ユニット23を制御して、第1の走査光学ユニット14の走査位置および範囲に依存しない任意の位置および範囲を選択することができる。

【0066】

このように第3の実施の形態においては、第1の走査光学系Aと第2の走査光学系Bが、それぞれ結像レンズ41および43を備えているため、第1の走査光学系Aおよび第2の走査光学系Bの光軸が平行光で容易に合成できる。

【0067】

つまり、第1の走査光学系Aを備える走査型レーザー顕微鏡Dと第2の走査光学系Bを備える照明光導入装置Eとの接続部分の光束が平行光になるので、走査型

レーザー顕微鏡Dと照明光導入装置Eを接続する際の光軸合せが簡単になる。

【0068】

また、第1の走査光学系Aを走査型レーザー顕微鏡Dとして構成し、第2の走査光学系Bを照明光導入装置Eとして構成することで、それぞれ異なる装置として形態を成すことができ、照明光導入装置Eを走査型レーザー顕微鏡Dのシステムアップ用の装置として提供できる。

【0069】

また、照明光導入装置Eを構成する第2の走査光学系Bの走査光学ユニット23含まない構成することで、制御が容易で安価な装置として提供できる。

【0070】

【発明の効果】

本発明によれば、検出光路上に特異現象を発現させるレーザー光を遮断するフィルタを配置することで、画像取得用レーザー光と特異現象発現用レーザー光を同時に照射でき、鮮明な蛍光画像を取得できる走査型レーザー顕微鏡を提供できる。

【0071】

また、画像取得用の走査光学系および特異現象を発現させる走査光学系の結像レンズを別構成とすることで、システムアップを行いやすい走査型レーザー顕微鏡を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明に係る走査型レーザー顕微鏡の構成図。

【図2】

フィルタの透過率波長特性を示す図。

【図3】

ダイクロイックミラーの透過率波長特性を示す図。

【図4】

第2の実施形態に係る走査型レーザー顕微鏡の構成図。

【図5】

第 3 の実施形態に係る走査型レーザー顕微鏡の構成図。

【図 6】

従来の走査型レーザー顕微鏡の構成を示す図。

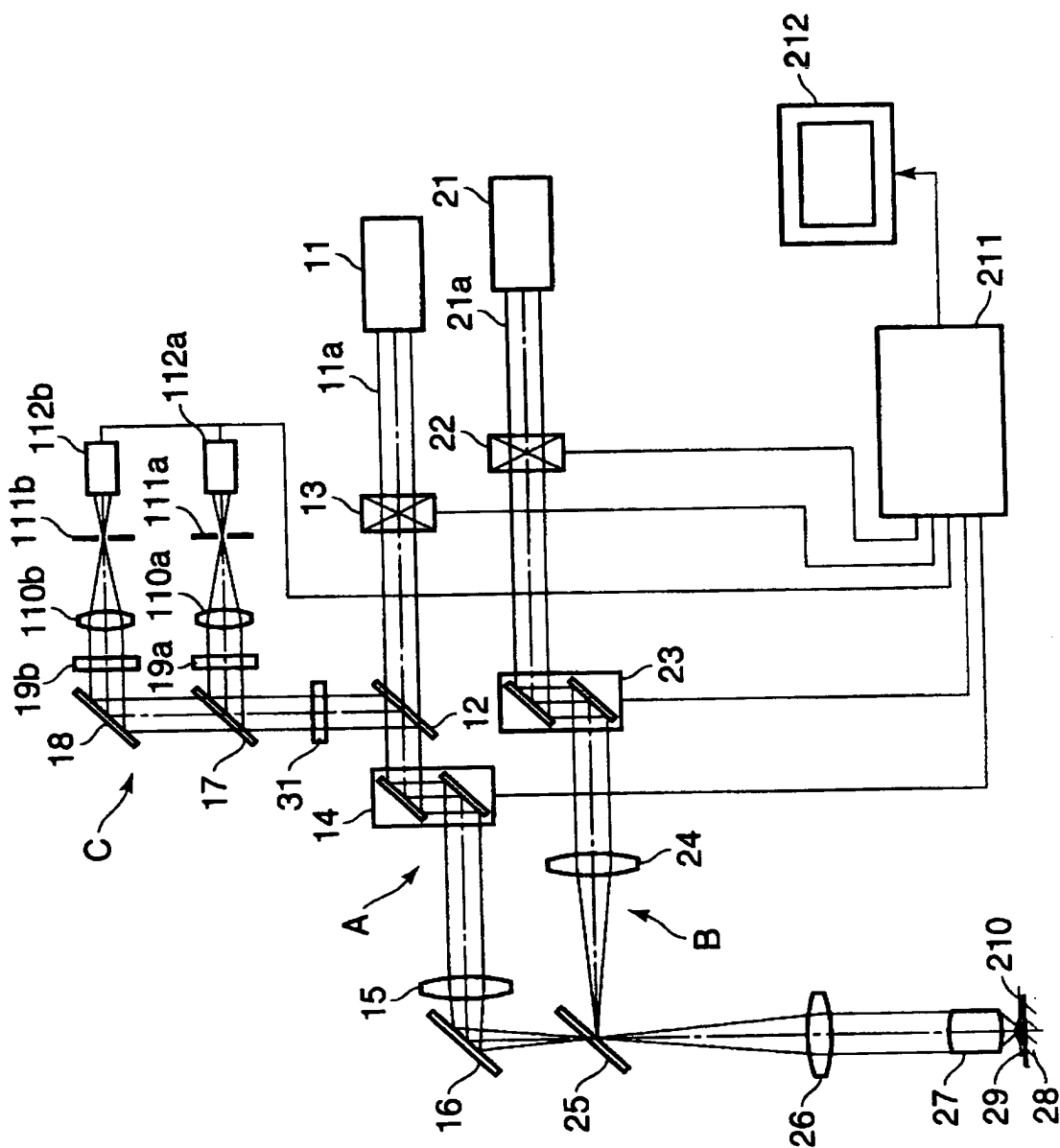
【符号の説明】

- 1 1 …第1のレーザー光源
- 1 2 …第1のレーザーシャッタ
- 1 3 …ダイクロイックミラー
- 1 4 …第1の走査光学ユニット
- 1 9 a …吸収フィルタ
- 1 9 b …吸収フィルタ
- 2 1 …第2のレーザー光源
- 2 2 …第2のレーザーシャッタ
- 2 3 …第2の走査光学ユニット
- 2 5 …ダイクロイックミラー
- 2 9 …試料
- 3 1 …吸収フィルタ
- 3 2 …電動ターレット
- 3 3 …電動ターレット
- 3 4 …UVパルスレーザー
- 3 5 …波長可変IRパルスレーザー
- 3 6 …レーザーシャッタ
- 3 7 …レーザーシャッタ
- 4 7 …電動ターレット
- 1 1 2 a …光電変換素子
- 1 1 2 b …光電変換素子

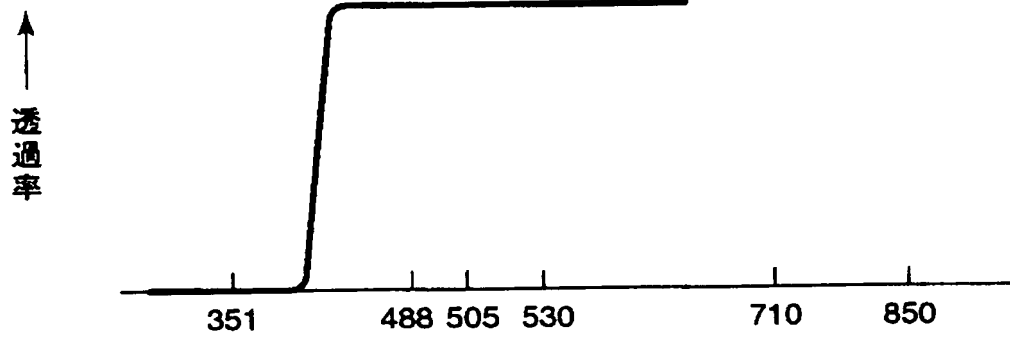
【書類名】

図面

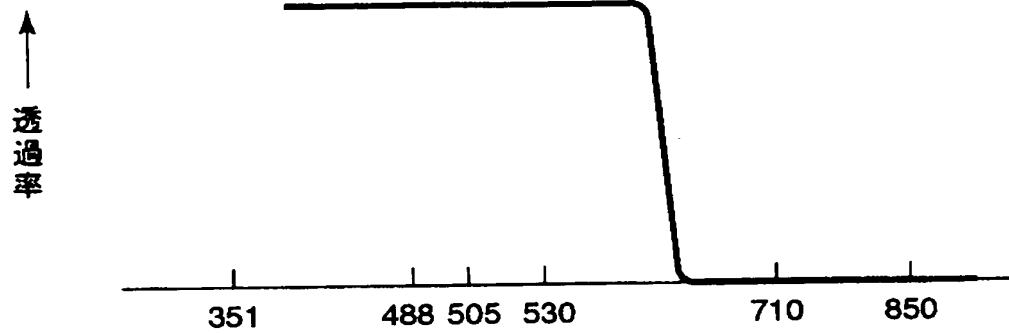
【図 1】



【図 2】

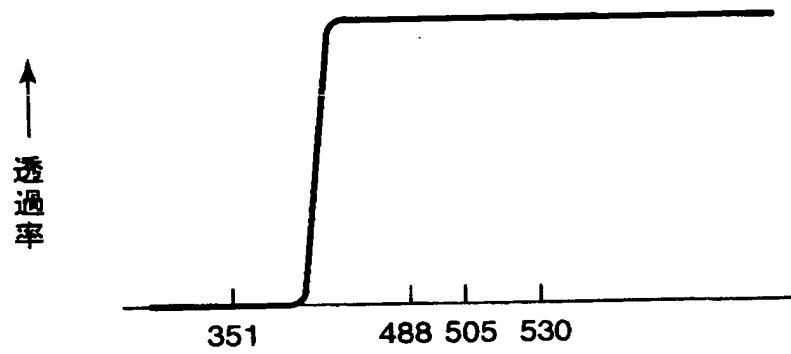


(a)

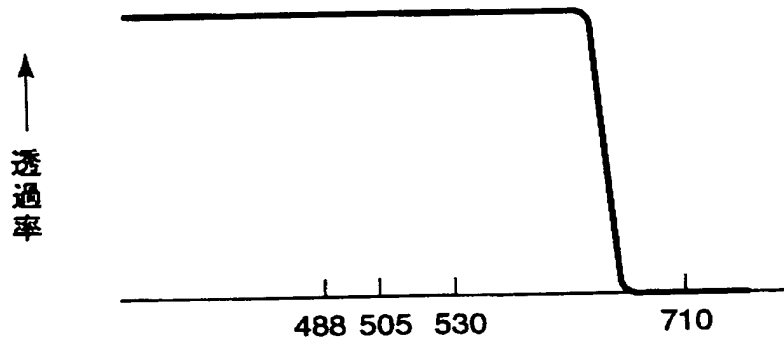


(b)

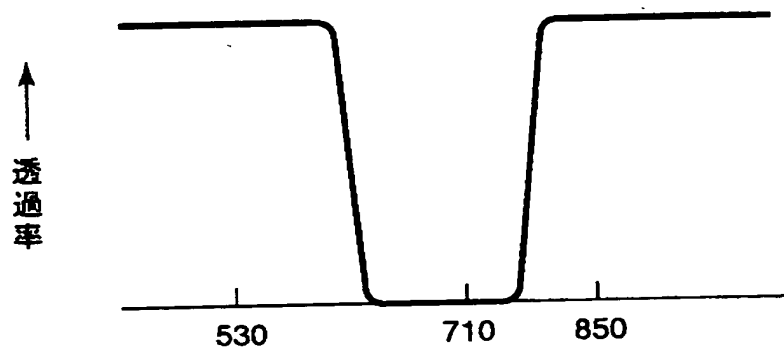
【図 3】



(a)

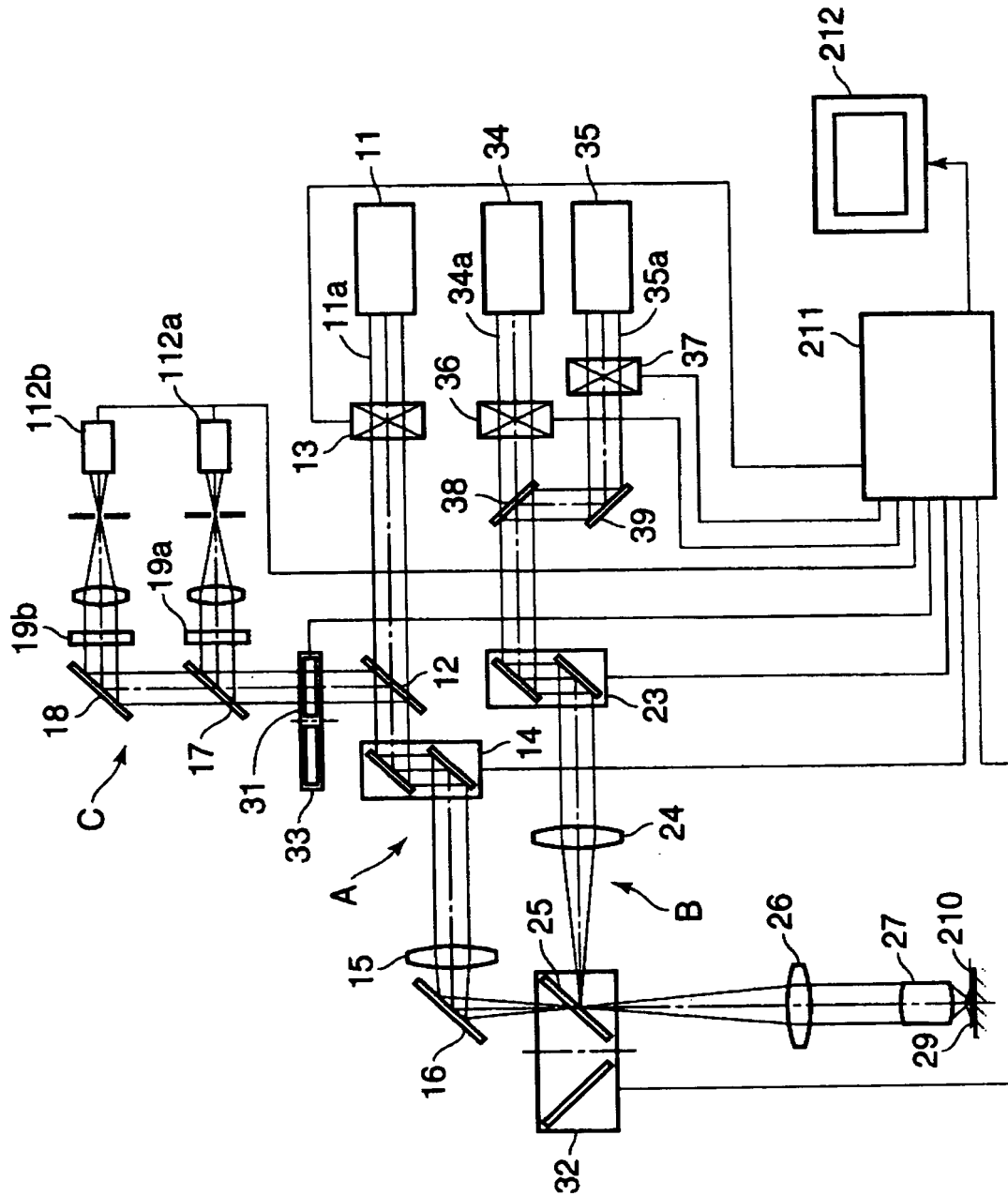


(b)

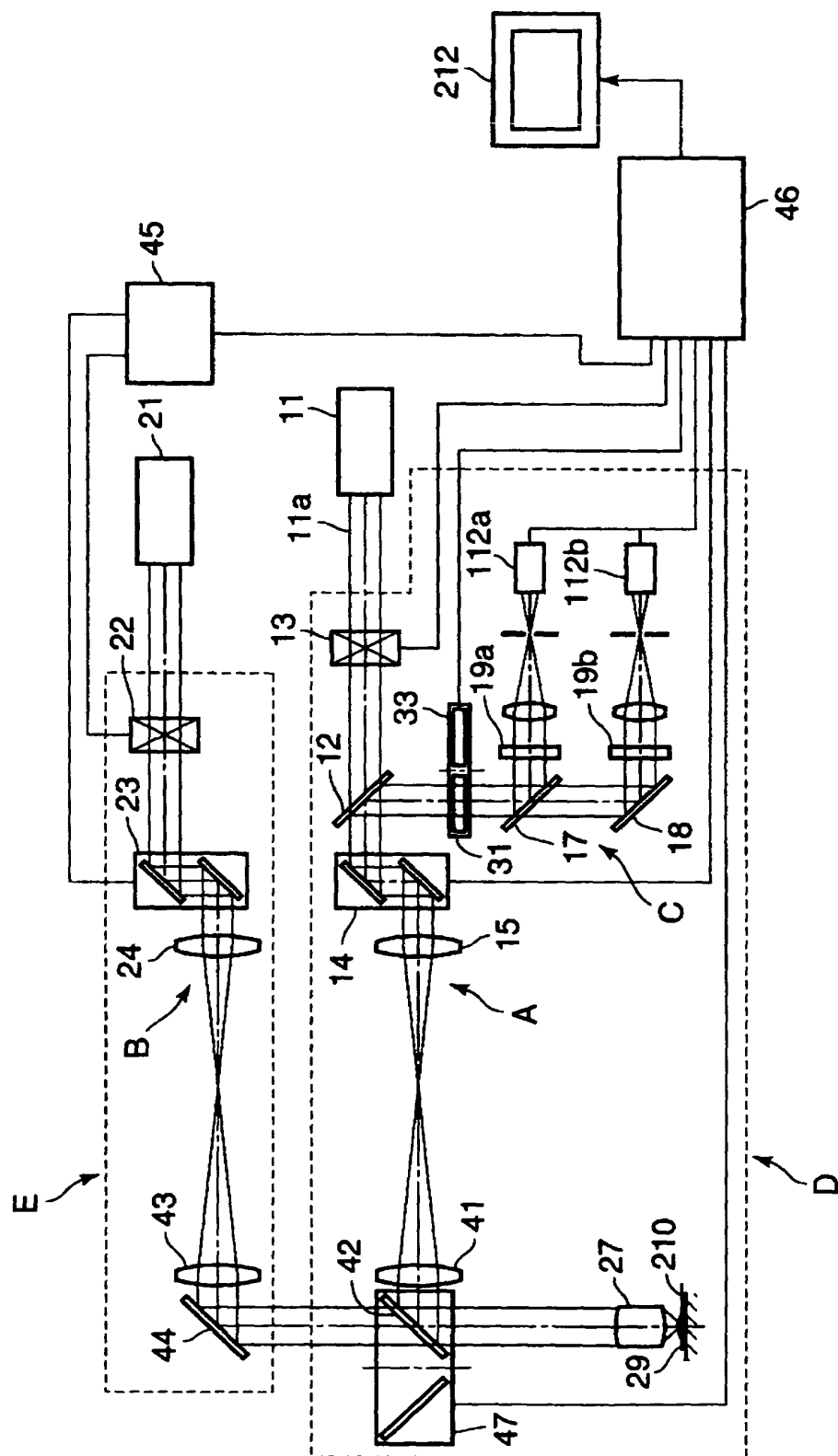


(c)

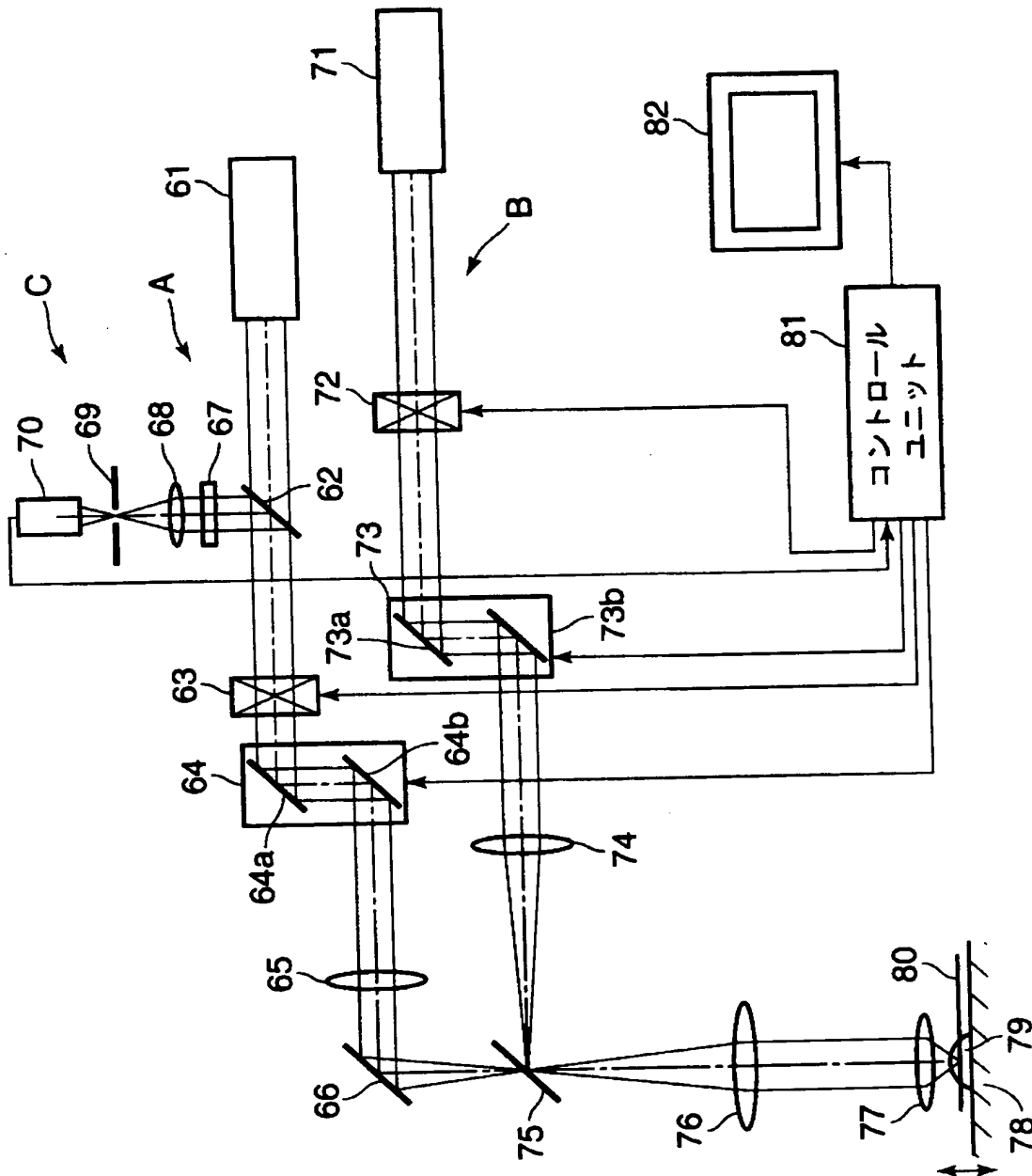
【図 4】



【図 5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 複数の走査光学系を使用した場合においても、第2のレーザー光が第1の走査光学系の光検出系に進入することを防ぎ、第1の走査光学系のレーザー光により励起された蛍光を効率良く検出することが可能な走査型レーザー顕微鏡を提供する。

【解決手段】 レーザー光を走査装置により対物レンズを介して試料上を走査し試料からの蛍光を特定の波長を透過する蛍光測光フィルタを介して光検出器により検出するための第1の走査光学系と、試料上の特定の部位にレーザー光を導入するための第2の走査光学系と、試料上からの反射された第2の走査光学系からのレーザー光が第1の走査光学系の光検出器へ入射することを遮断するための吸収フィルタとを備えた走査型レーザー顕微鏡である。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000376]

1. 変更年月日	1990年 8月20日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
氏 名	オリンパス光学工業株式会社